中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 48(4) 52～63(1999)

以逢機增殖多型性DNA(RAPD)進行火鶴花栽培種鑑定與遺傳歧異性之分析[1]

王昭月[2] 莊耿彰[3] 范明仁[2]

摘要：本研究以農業試驗所『火鶴花育種計畫』中收集的15個栽培種爲材料，探討利用逢機增殖多型性DNA(randomly amplified polymorphic DNA；RAPD)分子技術作爲品種鑑定及遺傳歧異性分析。試驗結果顯示，自8條含有10個核甘酸的逢機引子經聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction；PCR)產物中，有24個特定的DNA多型性標誌片段，可用以鑑別出14個栽培種。進一步以此8個多型性表現高的引子，將其PCR反應產物160個RAPD片段，合併進行UPGMA(unweighted pair-group mean arithmetic)群集分析，結果獲得三個主要群組。第一群包含8個栽培種，其佛燄苞顏色(花色)主要爲紅色系。第二群爲6個栽培種組成，主要爲源自夏威夷育成之品種。而第一、二兩群14個栽培種均屬*Anthurium andraeanum*。第三群則僅有一個獨立的栽培種 "Southern Blush" ，爲*A. andraeanum* X *A. amnicola*之種間雜交種。試驗結果顯示，利用RAPD兼具有鑑別火鶴花栽培種之能力，亦可用以估測品種間基因型之遺傳相似性，此對於未來藉以選拔遺傳歧異高的雜交親本及新雜交組合的獲得，將有所助益。整體而言，RAPD分析技術對於加速火鶴花育種效率，應具有實用價值。

關鍵詞：火鶴花、育種、逢機增殖多型性 DNA、鑑定、遺傳歧異性。

前　言

根據台灣農業年報(1996、1997年)[1,2]，火鶴花爲本省十大經濟切花之一，原產於中南美洲熱帶地區，性喜高溫多濕，適合台灣氣候栽培。火鶴花屬(*Anthurium*)包含"種"(species)數多達1000個(Kamemoto,1996)[18]。依植物分類(如植株形態、花形等)通常區分成18 個sections，其中Calomystrium section內的 *A. andraeanum* 是全球主要經濟栽培之切花用種原，其特性爲肉穗黃至白，花型爲中至大花，花梗直立且長，花型華麗對稱，花色多(有紅、粉紅、橙、白、綠色，以及混合不同顏色的雙色系)；另外Porphyrochitonium section(如：*A. amnicola*)爲重要之盆花種原,具明顯多花性[18]。農試所爲開發自有品種，自1989年起著手進行引種及雜交育種工作，除上述兩個主要『種』以外，並逐年自國內外引進新興優良品種，合計目前收集品種數達90個以上，皆提供作爲雜交育種用親本。火鶴花育種工作執行迄今，已完成近200個雜交組合，有三萬多株雜交後裔，並自1996年起進行雜交後代之單株選拔。火鶴花自播種至開花，約須18個月之生長期，傳統田間調查選拔較爲耗時費工，而自1996至2000

1. 行政院農業委員會農業試驗所 研究報告第2000號。
2. 本所作物種原室助理研究員、研究員兼主任。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。
3. 本所園藝系助理研究員。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

年間，農試所的雜交後裔開花株將達數萬株以上，屆時開花特性調查及優良單株選拔工作，勢必非常龐大且繁重。

近二十年來，由於分子生物鑑定技術蓬勃發展，已成為輔助育種選拔或品種鑑定上快速而有效的工具之一。其中最常利用的有蛋白質層次的同功異構酵素(isozyme)[19]；DNA層次的RFLP(restriction fragment length polymorphism)[28]、RAPD(random amplified polymorphic DNA)[3,8,26]，以及新近發展中的SSR(simple sequence repeat)[6,30]與AFLP(amplification fragment length polymorphism)等。唯同功異構酵素受限於可供標誌基因座較少，不若DNA分子層次分析之多型性高且穩定。故自Kary Mullis(1984)提出PCR(polymerase chain reaction)技術後，利用DNA層次的分子生物標誌，已廣泛被利用於種原(品種)鑑定或植物育種後裔遺傳之評估[12]；另外對於種原演進，遺傳相似性等探討也視為一項有效的工具之一。分子生物標誌較傳統之植物性狀更具準確與快速性[23]。1990年Welsh[32]及William[33]更提出操作簡單的RAPD分析技術，由於可免除早期RFLP分析須高度技術性的操作與昂貴的分析成本，故於提出後短短十年間，已成為作物遺傳分析最簡便而有效的分子生物標誌之一，在小麥[5,29]、十字花科蔬菜[6,20,21]、豆類[4]、根莖作物(馬鈴薯[10]、芋[17]、甘藷[27])、木本果樹(柑橘[7]、梨[25]、酪梨[13]、杏仁[3])、香蕉[14]、草莓[9]、花卉作物(菊花[34]、康乃馨[28]、虎頭蘭*Cymbidium*[24])等，均有利用RAPD進行種原鑑別或特定基因分析之研究報導。RAPD分析對於多年生或幼年性長之果樹類或蘭花，作為品種鑑定及遺傳親緣關係探討，尤具有縮短時效之效益。本試驗材料火鶴花係屬多年生宿根花卉，自播種至開花評估，動輒費時二～三年，故本研究擬利用 RAPD分子生物鑑定技術，建立親本(栽培種)鑑別圖譜，並探討親本間之遺傳歧異性，俾提供未來雜交育種親本與後裔選拔之參考。

材料與方法

一、植物材料

自農業試驗所園藝系『火鶴花育種』計畫中，選取雜交用親本15個栽培種，其中包含目前主要的紅花栽培種" Tropical "、粉紅色"Lunette"、橙色"Nette"及雙色系"Paradiso"等；另外包含一個收集自本省苗圃，品種名稱不詳的小紅花品種 "P001"(表1)。供試驗用植株均為二年生以上之成熟開花株。

二、DNA萃取

DNA 萃取方法參考Murray(1980)[22]及Doyle(1990)[11]，取植株嫩葉0.4公克加入液態氮磨碎，加入500 μ1的 DNA 萃取緩衝液(2%(w/v) CTAB，100 mM Tris-HCl ，pH 8.0; 20 mM EDTA ；1.4 M NaCl ; 0.2%(v/v) β-mercaptoethenol)，再放入 60℃水浴 30 分鐘，輕輕混勻後加入500 μ1 chloroform-isomamyl alcohol (24：1 , v/v) ，混合均勻，在 4℃ 以14,000rpm 離心10 分鐘。取上清液加入 500 μ1之冰冷 isopropanol，混合均勻後放置在室溫下沉澱 1~2 小時(或 -20℃，隔夜)。再離心去上清液，再加入1 ml的 washing buffer(76% ethanol(v/v); 10 mM ammonium acetate)輕輕混勻後，再於 4℃ 下以 14,000 rpm 離心 10 分鐘，再去上清液將沉澱的 DNA 置於冷凍乾燥機吹乾。將凍乾之 DNA 沉澱 溶於 50 μ1的無菌水，再加入 RNase (10 μg/ml) 在 37℃ 下反應 20 分鐘。最後取 10 μ1的 DNA 溶液，稀釋 100倍並測定 OD 260 nm 之讀值，及計算 DNA 含量濃度。

三、聚合酵素連鎖反應(Polymerase Chain Reaction，PCR)

將萃取得之 genomic DNA 稀釋成 5 ng/ μ1 放置在 -20℃ 下，提供聚合酵素連鎖反應時，作為模板DNA。自Operon Kit(B、C、F、G、J) 共100種引子，進行15個栽培種之聚合酵素連鎖反應。反應液總

體積為 25 μl，內含 1 u Taq polymerase(Promega)、1×PCR buffer(50 mM KCl；10 mM Tris-HCl，pH 9.0；0.1% Triton 100)、2.0 mM MgCl2、200 μM dNTP、0.2 μM primer 及 50 ng template DNA。聚合酵素連鎖反應儀器為 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 960，反應溫度條件設定如下： 94℃ 3 分鐘，40℃ 1 分鐘，72℃ 1 分鐘；再進行43 次的94℃ 1 分鐘，40℃ 1 分鐘，72℃ 2 分鐘；最後72℃ 5 分鐘。反應完成後貯藏在 4℃。

表1. 進行RAPD之火鶴花栽培種

Table 1. 15 Cultivars and characters of *Anthurium* used in RAPD analysis

No.	Cultivars	Spathe Color	Spadix color	Stem color	Origin
1	Lydia	Pink	Pink	Red	AVO(Netherlands)
2	Lunette	Light -pink	Pink	Red	Flamingo(Netherlands)
3	Tropical	Red	Yellow-green	Green	Anthura (Netherlands)
4	Alexis	Red	Green	Green	AVO(Netherlands)
5	Fla-Success	Red	Yellow	Green	Flamingo(Netherlands)
6	Fuego	Red	Yellow	Green	AVO(Netherlands)
7	Inka	Deep Red	Yellow	Red	? (Netherlands)
8	Obake	Red/green	Yellow	Green	?(Hawaii)
9	Nette	Orange	Yellow	Re	AVO(Hawaii)
10	Fla-Exotic	White with red border	Yellow	Red	Flamingo(Netherlands)
11	Paradiso	Pink/green	Pink	Green	Anthura (Netherlands)
12	Southern Blush	Pink lavender	Lavender-brown	Red	Henny(Florida)
13	Evergreen	White/green	Red	Green	Anthura (Netherlands)
14	Asahi	White with red vein and border	Red-orange	Red	(Hawaii)
15	P001	Red	Yellow	Green	Unknown

四、DNA電泳

經聚合酵素連鎖反應而增殖之DNA ，取 12 μl 加入 6 倍的電泳緩衝液(6×loading buffer：0.25% bromophenol blue 及 xylene cyanol，40% w/v sucrose)，而RAPD分析係在 2.5% 的 agarose 以 TAE buffer (40 mM Tris acetate，pH 8.0；1 mM EDTA)進行 DNA 電泳；電泳槽為Cosmo, Mupid-2，電壓100 伏特，電泳時間約 25 分鐘，結束後置於 0.5 mg/ml 的 ethidium bromide 中染色 20-30 分鐘，再置於 UV 光箱中，檢視膠體上 DNA 多型性片段，並照相及貯存影像於 IS 2000 Digital Imaging System(Alpha Innotech Corporation) 進行分析。

五、資料分析

群集分析是採用 Gel-Compar 軟體，計算兩品系間所有分析的 RAPD條帶中相同條帶的比率。所有樣品兩兩分析後，以 UPGMA(unweighted pair-grouping mean arithmetical)估算相似性程度。PCR 產

物的 DNA 片段係以 Bio100 DNA Ladder(3000bp~100bp) 作爲估算分子量。並以 Jaccard's 相似性係數分析，相似性係數值(simple matching coefficient)的計算方式爲F = nxy/(nx+ny) - nxy。nx及ny分別代表X及Y品系的所有多型性 DNA 片段，nxy則表示X及Y品系間都共有的片段數，再於個人電腦中以 Gel-Compar 軟體進行 UPGMA 群體分析，估算品系間遺傳相似程度(similarity coefficient)。

結 果

自Operon 逢機引子組(random primer Kit B、C、F、G、J)共100個引子經PCR 反應，篩選出產物DNA多型性高的計8個引子：OP-B04(圖1-A)、OP-B17(圖1-B)、OP-C08(圖1-C)、OP-F06(圖1-D)、OP-F12(圖2-A)、OP-F16(圖2-B)、OP-G18(圖2-C)及OP-J14(圖2-D)。綜合此8個引子經PCR反應之所有產物，合計可產生160個RAPD片段，其中159個片段具多型性，反應產物表現多型性之比率爲99％，而平均每個引子反應可產生20個RAPD 片段，其分子量大小介於226bp至3,076bp(表2)。

一、火鶴花栽培種鑑定與 RAPD markers：

以多型性表現高的8個引子，分別篩選利用於栽培種鑑定之特定標誌片段。結果顯示，供試的15個栽培種除"Asahi"外，14個栽培種均可獲得鑑別用之特定標誌片段(RAPD marker)，總計篩選得24個RAPD markers(表2、表3)。而8個引子中，除OP-F12可產生7個特定標誌片段外，其餘每個引子可產生2~3個標誌片段(表2)。

表2. 火鶴花RAPD分析中具多型性之引子及其多型性特性
Table 2. Characteristics of polymorphic RAPD primer in *Anthurium*

Primers	Sequence	Product Size (bp)	No. of Fragments	Polymorphic Fragments	Specific Fragments for Identification
OP-B04	5'-GGACTGGAGT -3'	2,928~292	23	22	2
OP-B17	5'-AGGGAACGAG-3'	2,777~355	22	22	3
OP-C08	5'-TGGACCGGTG-3'	1,183~350	12	12	3
OP-F06	5'-GGGAATTCGG-3'	1,964~448	19	19	2
OP-F12	5'-ACGGTACCAG-3'	2,835~355	25	25	7
OP-F16	5'-GGAGTACTGG-3'	3,076~262	32	32	3
OP-G18	5'-GGCTCATGTG-3'	1,266~226	17	17	2
OP-J14	5'-CACCCGGATG-3'	2,621~406	10	10	2
Total bands			160	159	24
Average			20	19	

引子OP-G18反應產物中1,161bp片段，僅出現在 "Lydia"栽培種存在，具有標識之效。而"Lunette"栽培種則可由OP-G18反應產物中另一個226bp片段標識之。"Tropical"栽培種特有標誌片段有三個，分別是OP-B17產物中414bp片段、OP-C08 PCR產物中455bp片段，及OP-F16反應產物中262bp片段。"Alexis"栽培種可以OP-F12反應產物中690bp片段標誌。"Fla-Success"栽培種可以OP-B04反應產物中374bp片段標識。"Fuego"栽培種亦有二個可標誌片段，分別爲OPC08產物中1790bp片段，及OP-F16反應產物中278bp片段。"Inka"栽培種則以OP-F12反應產物中401bp片段，可以標識出。"Obake"栽培種以OP-F12反應產物中426bp片段標識之。"Nette"栽培種具有三個標識片段，分別爲OP-C08反應產物中483 bp片段，OP-F12反應產物中532bp片段，及OP-F16反應產物中421bp片段。"Fla-Exotic"栽培種可由

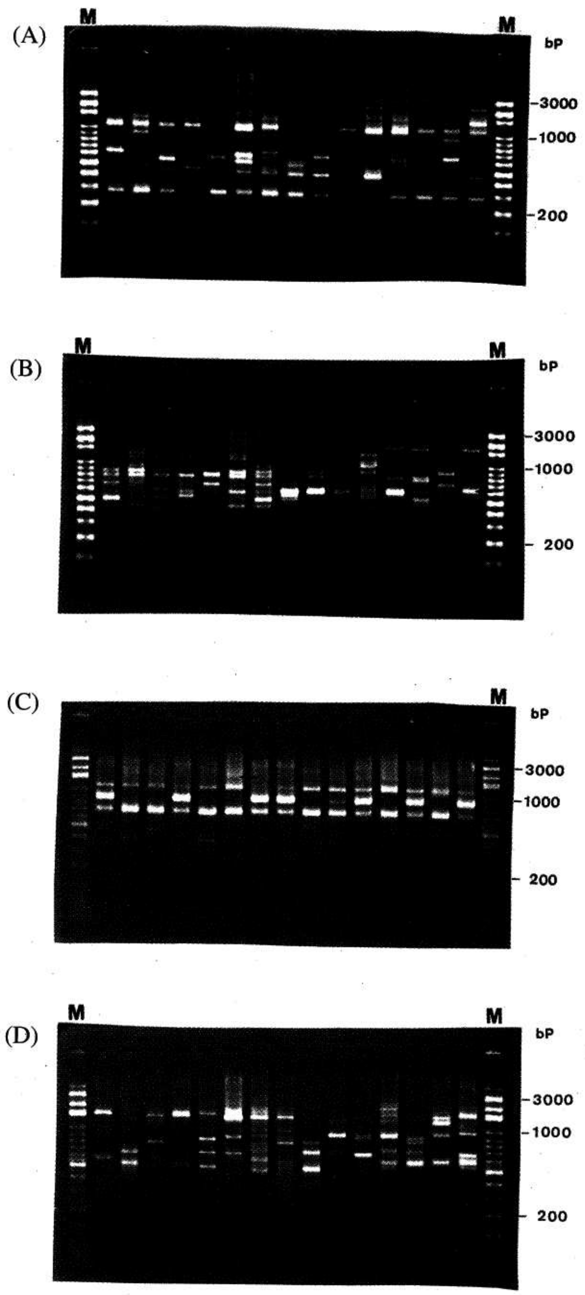

圖1. 火鶴花15栽培種(詳見表1) 之RAPD圖譜

Fig.1. RAPD profiles generated by 4 primers (A：OP-B04、B：OP-B17、C：OP-C08、D：OP-F06) and resolved by 2.5% agarose gel. Lane 1 and 17: molecular marker (Bio100 DNA Ladder). Lane2~16:cultivars tested as Table1.

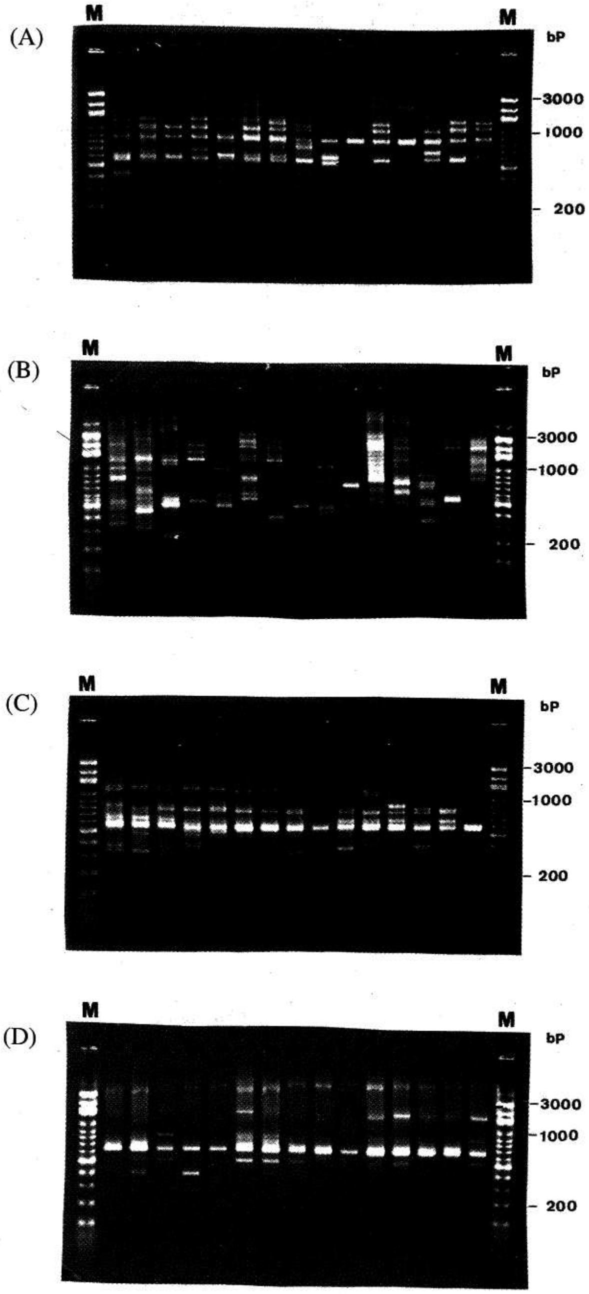

圖2. 火鶴花15栽培種(詳見表1) 之RAPD圖譜

Fig. 2. RAPD profiles generated by 4 primers (A：OP-F12、B：OP-F16 、C：OP-G18、D：OP-J14) and resolved by 2.5% agarose gel. Lane 1 and 17: molecular marker (Bio100 DNA Ladder). Lane2~16:cultivars tested as Table1.

OP-J14反應產物中1,014bp片段標識。"Paradiso"栽培種具有二個標識片段，其一爲OP-B17反應產物中1,378bp片段，另一標誌爲OP-F12反應產物中2,790bp片段。種間雜交種"Southern Blush"具有二個標誌片段，分別爲OP-F06反應產物中1,964bp片段，及OP-F12反應產物中448bp片段。"Evergreen"栽培種有二個標誌片段，分別爲OP-B04產物中764bp片段，及OP-F12反應產物中1,544bp片段。小紅花"P001"也有二個標誌片段，分別爲OP-F06反應產物中1,964bp片段，及OP-F12反應產物中448bp片段(表3)。

表3. 火鶴花各栽培種鑑定之特定RAPD標誌片段
Table 3. Specific RAPD markers within 15 cultivars of *Athurium*

Cultivars	Primers (specific fragment)
Lydia	OP-G18(1,161 bp)
Lunette	OP-G18(226 bp)
Tropical	OP-B17(414 bp)、OP-C08(455 bp)、OP-F16 (262bp)
Alexis	OP-F12(690bp)
Fla-Success	OP-B04(374 bp)
Fuego	OP-C08(1,790bp) 、OP-F16(278 bp)
Inka	OP-F12(401 bp)
Obake	OP-F12(426 bp)
Nette	OP-C08(483bp) 、OP-F12(532 bp)、OP-F16(421 bp)
Fla-Txotic	OP-J14(1,014 bp)
Paradiso	OP-B17(1,378 bp)、OP-F12(2,790 bp)
Southern Blush	OP-F06(1,964 bp) 、OP-F12(448 bp)
Evergreen	OP-B04(764 bp) 、OP-F12(1,544 bp)
P001	OP-B17(626 bp)、OP-F06(1,138 bp) 、OP-J14(2,621 bp)

二、火鶴花栽培種間遺傳歧異性之分析

將8個引子PCR反應之所有多型性DNA片段，合併以Jaccard's相似性係數(similarity coeffient)[5]構築相似性矩陣(similarity matrix)，並進行UPGMA群集分析。結果供試的15個栽培種間，相似性最高爲"Tropical"與"Fuego"，其相似性係數爲0.73。相對地，"Southern Blush"與其餘14個栽培種間相似性係數最低，相似性係數爲0.4~0.52(表4)。由遺傳相似性之群集樹狀圖結果顯示，15個栽培種主要可分成三群：第一群包含8個栽培種("Tropical"、"Fuego"、"Lunette"、"Alexis"、"P001"、"Inka"、"Evergreen"、"Paradiso")，群集遺傳相似性係數爲0.53，其中均爲紅花系之"Tropical"與"Fuego"相似性係數最高爲0.73，其次爲同屬紅花系之"Alexis"與"P001"，相似性係數爲0.67。基本上，同爲紅花系的栽培種間遺傳相似性較近，在樹狀圖有相依及群集的趨勢(圖3)，另外本群栽培種除"P001"、"Inka"品種來源不明外，其餘育種來源均爲荷蘭。第二群包含6個栽培種("Fla-Success"、"Nette"、"Lydia"、"Asahi"、"Obake"、"Fla-Exotic")，群集遺傳相似性係數爲0.54，其中紅花系栽培種"Fla-Success"或橘紅色"Nette"

表4. 火鶴花15個栽培種之RAPD markers以Jaccard's 計算之相似性矩陣

Table 4. Similarity matrix for Jaccard's coefficient among 15 cultivars of *Anthurium*

Cultivar	No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Lydia	1	1.00														
Lunette	2	0.57	1.00													
Tropical	3	0.58	0.60	1.00												
Alexis	4	0.55	0.57	0.51	1.00											
Fla-Success	5	0.61	0.57	0.61	0.61	1.00										
Fuego	6	0.52	0.55	0.73	0.59	0.51	1.00									
Inka	7	0.53	0.56	0.63	0.64	0.56	0.64	1.00								
Obake	8	0.54	0.44	0.50	0.58	0.65	0.48	0.56	1.00							
Nette	9	0.48	0.44	0.55	0.51	0.58	0.49	0.43	0.46	1.00						
Fla-Exotic	10	0.58	0.47	0.61	0.50	0.49	0.55	0.52	0.66	0.54	1.00					
Paradiso	11	0.43	0.46	0.52	0.58	0.45	0.59	0.46	0.42	0.37	0.45	1.00				
S.B[z]	12	0.46	0.46	0.49	0.52	0.48	0.50	0.40	0.41	0.45	0.48	0.50	1.00			
Evergreen	13	0.59	0.58	0.46	0.63	0.55	0.47	0.54	0.51	0.53	0.51	0.53	0.60	1.00		
Asahi	14	0.65	0.52	0.52	0.53	0.55	0.57	0.51	0.60	0.53	0.65	0.41	0.50	0.54	1.00	
P001	15	0.57	0.50	0.50	0.67	0.49	0.60	0.65	0.56	0.47	0.60	0.60	0.51	0.64	0.55	1.00[Y]

[z] Cultivar S.B.："Southern Blush"

[Y] Range of value from 0 to 1.00 , values closer to 1.00 indicating increasing similarity

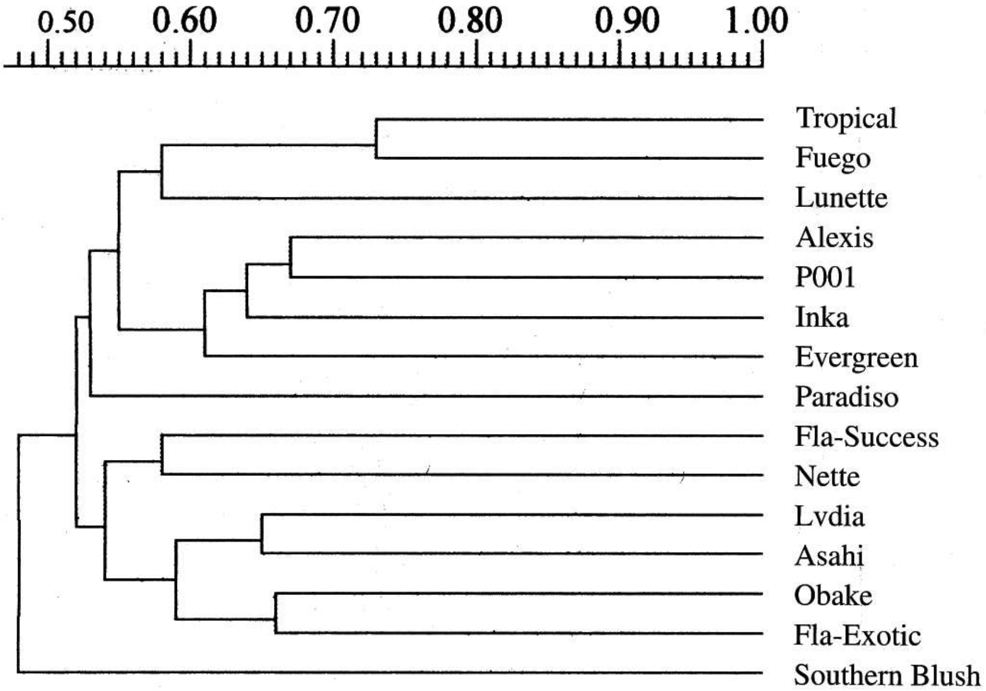

圖3. 火鶴花15個栽培種之RAPD圖譜，經UPGMA Jaccard's計算之相似性樹狀圖

Fig. 3. Dendrogram illustrating genetic relationship among 15 cultivars of *Anthurium*, geneated, by UPGMA cluster annlysis calculated from 160 RAPD markers produced by eight primers. The scale on the top is Jaccard's coefficent of sumularity

栽培種，皆明顯相異於其他粉、白色系之栽培種，而相異性大的這兩個栽培種間之遺傳相似性係數僅0.58(圖3)；另外源自夏威夷育成之栽培種"Nette"、 "Asahi"、 "Obake"則均同位於第二群中。第三群則僅有一個獨立的栽培種"Sourthern Brush" ，此爲*A. andraenum* X *A. amnicola*之種間雜交種，是由美國-佛羅里達大學所育成之栽培種[15,16]。綜合15個栽培種間之遺傳相似性係數爲0.48。

討　論

就多年生營養繁殖型作物而言，以傳統植物性狀作爲品種鑑別或遺傳基因型分析時，易受環境影響性狀表現，且必然面臨較冗長的評估時間與人力花費，此對於育種工作也是導致延緩時效的原因之一。有鑑於此，Kobayashi(1987)等人，曾著手研究以同功異構酵素鑑定栽培種[19]，期望藉由生化技術，以快速正確地達到種原鑑定目的，並加速品種評估之效率。唯試驗結果顯示，測定的酵素除"過氧化酵素"(peroxidase, PRX)圖譜表現較穩定外；其餘在品種間具多型性之MDH(malate dehydrogenase)、PGI(phosphoglucose isomerase)等酵素活性，表現似乎不穩定，且分析之酵素圖譜也未能完全清晰辨識[19]。嗣後，以分子生物標誌進行火鶴花種原鑑定及遺傳分析，未見進一步具體提出。推測可能如Kobayashi提出的說明，也受限於火鶴花葉片存在大量多酚類聚合物，影響酵素等分子萃取之品質。而本研究中，亦同樣發現由葉片萃取之DNA產量偏低，DNA純度不好，大部分的品系均須重複萃取，才能取得提供PCR反應用之DNA(OD260/OD280=1.7~2.0)。故針對未來如擬以PCR分析技術進行火鶴花大量後裔選拔，其分析用之DNA萃取技術，仍有待進一步研究改進。

Wannakrairoj及Kamemoto(1990)[31]在火鶴花之花色遺傳育種研究上，指出火鶴花主要的五個花色(紅、粉紅、橘紅、珊瑚粉、白色)，係由二個花青素cyanidin 3-rutinoside(cyanidin 3-rhamnosylglucoside) 及pelagonidin 3-rutinoside(pelagonidin 3-rhamnosylglucoside)的濃度和比値所決定。而這二個花青素則分別由二個主效基因所控制，其中M基因控制cyanidin 3-rutinoside的生合成；O基因控制pelagonidin 3-rutinoside的生合成。唯調控基因-P基因，具有調控M基因與O基因表現之作用。在P基因爲顯性時：基因型 "M-O-"花色表現爲紅花系，其中包含佛焰苞顏色爲紅色或粉紅色者；而基因型"mm-O-"花色表現爲橘紅色系，其中包含佛焰苞顏色爲橘紅色或珊瑚粉色者。隱性基因oo對M基因呈上位性，基因型"-oo"花色表現爲白色。在pp隱性基因下：M-O-pp基因型花色表現爲紫色。前人有關花色基因之研究，與本試驗中以RAPD分析15個栽培種間之遺傳關係時，所發現同紅花色或同育種地區的品種，其遺傳相似性係數較高，在樹狀圖的關係位置相近且有群聚的趨勢符合。鑑於花色爲火鶴花育種選拔一項重要性狀，及已知控制花色爲三對主效基因之表現，未來應可考慮選用更多不同花色族群，以較大量的樣品材料，探討利用RAPD或其他相關之PCR分析技術，進行花色基因之標誌，以提供育種選拔之參考。

引用文獻

1. 台灣農業年報。1996。385頁。台灣省政府農林廳。
2. 台灣農業年報。1997。403頁。台灣省政府農林廳。
3. Bartolozzi F., M. L. Warburton, S. Arulsekar , and T. M. Gradziel. 1998. Genetic characterization and relatedness among California almond cultivars and breeding lines detected by randomly amplified lymorphicDNA (RAPD) analysis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123(3):381-387.
4. Briand L. , A. E. Brown , J. M. Lenne, and D. M. Teverson. 1998. Randomly amplified polymorphic DNA variation within and among bean landrace mixtures (*Phaseolus vulgaris* L.) from Tanzania. Euphytica 102:371-377.
5. Cao, W. , P. Hucl , G. Scoles, and R. N. Chibbar. 1998. Genetic diversity within apelta and macha wheats based on RAPD analysis. Euphytica 104:181-189.

6. Charterers, Y.M., A. Robertson, M.J. Wilkinson, and G. Ramsay. 1996. PCR analysis of oilseed rape cultivars *Brassica napus* L. ssp. oleifera) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. Theor. Appl. Genet. 92:442-447.
7. Coletta Filho, H. D., M. A. Machado , M.L.P.N. Targon, M.C. P.Q.D.G. Moreira , and J.Pompeu Jr. 1998. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. Euphytica 102:133-139.
8. De Bustos, A. , C. Casanova , C. Soler , and N. Jouve. 1998. RAPD variation in wild population of four species of the genus *Hordeum* (Poaceae). Theor Appl Genet. 96:101-111.
9. Degani, C. , L. J. Rowland , A. Levi , J. A. Hortynski , and G. J. Galletta. 1998. DNA fingerprinting of strawberry (*Fragaria ananassa*) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Euphytica 102:247-253.
10. Demoke, T., D. R. Lynch, L.M. Kawchuk, G. C. Kozub, and J. D. Armstrong. 1996. Genetic diversity of potato determined by random amplified polymorphic DNA analysis. Plant Cell Rep. 15:662-667.
11. Doyle, J.J., and J.L.Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.
12. Erlich, H. A. . 1989. PCR technology. pp 246. Stockton Press. New York.
13. Fielder, J. , G. Bufler , and F. Bamgerth. 1998. Genetic relationships of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPD markers. Euphytica 101:249-255.
14. Grajal-Martin, M. J. , G. Siverio-Grillo , and A. Marrero-Dominguez. 1998. The use of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for the study of genetic diversity and somaclonal variation in *Musa* . Acta Hort. 490:445-454.
15. Henny, R. J., R.T. Poole, and C.A. Connover. 1988. "Southern Blush" A hybrid *Anthurium* for floiage producers. Circular, Agriculture Experiment Station, No.S-350 . pp.4. University of Florida.
16. Henny, R. J., R.T. Poole, and C.A. Connover. 1988. "Southern Blush" *Anthurium* . Hortscience. 23(5)：922-923.
17. Irwin, S.V. , P. Kaufusi ,K. Banks , R. de la Pena , and J.J. Cho. 1998. Molecular characterization of taro (*Colocasia esculenta*) using RAPD markers. Euphytica 99:183-189.
18. Kamemoto, H. and A. R. Kuehnle. 1996. Breeding Anthuriums in Hawaii. pp.132. University of Hawaii Press.19. Kobayashi R. S. , J. L. Brewbaker , and H. Kamemoto. 1987. Identification of *Anthurium andraeanum* cultivars by gel electrophoresis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112(1) : 164-167.
20. Kresovich, S., J. G. K. Williams, J. R. McFerson, E. J. Routman, and B. A. Schaal. 1992. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. Theor. Appl. Genet. 85:190-196.
21. Mailer, R. J., R. Scarth, and B. Fristensky. 1994. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. Theor. Appl. Genet. 87: 697-704.
22. Murray, M.G., and W.F. Tompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl.Acid Res. 8: 4321-4325.
23. Nicese, F.R. , J.I. Hormaza , and G.H. McGranahan. 1998. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotype based on RAPD markers. Euphytica 101:199-206.
24. Obara-Okeyo, P. , and S. Kako. 1998. Genetic diversity and identification of *Cymbidium* cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Euphytica 99:95-101.
25. Oliveira, C.M. , M. Mota , L. Monte-Corvo , L. Goulao , and D.M. Silva. 1999. Molecular typing of Pyrus based on RAPD markers. Sci. Hort. 79:163-174.
26. Ruas, P. M. , A. Bonifacio , C. F. Ruas , D. J. Fairbanks , and W. R. Andersen. 1999. Genetic relationship among 19 . accessions of six species of *Chenopodium* L., by random amplified polymorphic DNA fragments (RAPD). Euphytica 105:25-32.
27. Sagredo, B. , P. Hinrichsen , H. Lopez ,A. Cubillos , and C. Munoz. 1998. Genetic variation of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.) cultivated in Chile determined by RAPDs. Euphytica 101:193-198.
28. Scovel, G., H. Ben-Meir, M. Ocadis, H. Itzhaki, and A. Vainsein. 1998. RAPD and RFLP markers tightly linked to the locus controlling carnation (*Dianthus caryophyllus*) flower type. Theor. Appl. Genet. 96:117-122.
29. Sun, Q. , Z. Ni , Z. Liu , J. Gao , and T. Huang. 1998. Genetic relationships and diversity among Tibetan wheat, common wheat and European spelt wheat revealed by RAPD markers. Euphytica 99:205-211.
30. Wang, Z., J.L. Weber, G. Zhong, and S.D. Tanksley. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. Theor. Appl. Genet. 88:1-6.

31. Wannakrairoj, S. and H. Kamemoto. 1990. Inheritance of purple spathe in *Anthurium*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115(1) :169-171.

32. Welsh, J. and M. McClelland. 1991. Genomic fingerprinting using arbitrarily primer PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. Nucleic Acids Res. 19: 5275-5279.

33. Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.

34. Wollf, K., E. Zeitkiewicz, and H. Hofstra. 1995. Identification of *chrysanthemum* cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. Theor. Appl. Genet. 91:439-447.

Randomly Amplified Polymorphic DNA(RAPD) Markers for Identification and Genetic Diversity Analysis of *Anthurium* Cultivars[1]

Jau -Yueh Wang [2] Keng-Chang Chuang[3] and Ming- Jen Fan[2]

Summary

Fifteen *Anthurium* cultivars collected for the breeding program of Taiwan Agriculture Research Institute were evaluated by randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) technique. Objectives were to assess genetic diversity within the cultivars and survey the identification markers. Twenty-four DNA fragments derived from eight primers are polymorphic and can be used to distinguish the fourteen cultivars. A dendrogram generated by UPGMA(Un-weighted Pair-group Mean Arithmetic) cluster analysis from 160 RAPD fragments that all amplified by eight primers, divided the fifteen cultivars onto three main groups. The first group comprised eight cultivars, all with red spathe. The second group comprised six cultivars that mainly original derived from the breeder of Hawaii. The fourteen cultivars within these two groups, belonging to *Anthurium andraeanum*, while only with one culivar "Southern Blush" in the third group, is a hybrid from *A. andraeanum* X *A. amnicola.* The results suggest that RAPD markers are useful in current breeding program of *Anthurium*, and allowing the identification within different cultivars as well as the estimation the genetic similarity among genotypes, which will be valuable in selecting the best parents and to obtain new combinations.

Key words：*Anthurium* , Breeding, Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD), Identification, Genetic diversity

---

1. Contribution No. 2000 from Taiwan Agriculture Research Institute, Council of Agriculture.

2. Respectitvely , Assistant Agronomist, Research Fellow and Head, Crop Genetic Resources Laboratory, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.

3. Assistant Horticulturist , Department of Horticulture, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.